

DISPUTANDUM

Effect of Hyperbaric Oxygen on Leucocyte Lysosomes

It has been suggested that lysosomal damage may play an early and important role in the chain of events leading to cell and tissue damage by oxygen at normobaric or hyperbaric pressure. According to this view, many or all of the other effects associated with oxygen poisoning should be viewed as a consequence of this initial lesion^{1,2}.

This proposal is attractive. Lysosomes possess an enormous potential for damage, they are easily peroxidized³, and they contain a high density of membrane sulfhydryl groups⁴. On the other hand, there has yet to be a convincing demonstration that isolated lysosomes are sensitive to oxygen. Since lysosomes are involved in the autophagic sequelae to any serious cellular injury it is often difficult, especially in intact animals, to distinguish such secondary changes from those constituting a truly 'primary' event. The present study was therefore undertaken to examine the effect of high pressure oxygen (OHP) on lysosomes of an isolated cell system.

Methods. Rabbit polymorphonuclear leucocytes (PMN) were obtained from peritoneal exudates. The methods of cell collection, cell fractionation, and enzyme and protein assay have been detailed elsewhere^{5,6}. Freshly harvested cells (98% PMN) were placed in a shallow plastic dish (2 mm depth of fluid), equilibrated with oxygen for 5 min, then compressed to 5 atmospheres absolute (ATA) of oxygen for 30 or 50 min. The pressure vessel was thermostated at 35 °C and the cell suspension was swirled during exposure by 3 gentle streams of gas impinging on its surface from angled microjets. Following exposure, cells were disrupted by gentle pipetting in 0.34 M sucrose and protein and aryl sulfatase were measured in the homogenate after repeated freezing and thawing ('total') and in the supernatant obtained by high speed centrifugation of the homogenate ('free'). Free aryl sulfatase activity was corrected for slight differences in the amount of cell breakage (as indicated by the amount of soluble protein

in the homogenates) to reduce artefactual variability between experiments.

Results and discussion. In several experiments conducted in different media and with exposures up to 50 min, no differential leakage of lysosomal aryl sulfatase was detected (Table). An attempt to 'stress' the granules by deliberately applying excessive force during the cell disruption procedure increased enzyme leakage from both control and OHP cells alike (experiments 5 and 6, Table). The final percentage of cells broken by the disruption procedure was similar in both control and OHP-exposed cells, although there was a subjective impression that the latter disrupted more readily than the former. Aryl sulfatase was not inactivated by high pressure oxygen.

Lysosomes isolated from PMN also were unaffected by 30 min of OHP, as shown by the absence of additional protein-leakage from exposed granules. (Protein leakage parallels leakage of lysosomal enzymes⁷.) This result, which is in sharp contrast to the immediate disruption caused by ionizing radiation⁸, is in complete accord with other evidence^{8,9} that hyperbaric oxygen and ionizing radiation do not share a common mode of action despite the superficial similarities between them¹⁰.

The results show very clearly that hyperbaric oxygen does not produce measurable lysosome damage during

¹ A. C. ALLISON, *Nature* 205, 141 (1965).

² I. H. HALL and A. P. SANDERS, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 121, 1203 (1966).

³ E. D. WILLS and A. E. WILKINSON, *Biochem. J.* 99, 657 (1966).

⁴ J. W. HARRIS, *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.*, in press.

⁵ J. W. HARRIS, *Radiat. Res.* 28, 766 (1966).

⁶ J. W. HARRIS, *Int. J. Radiat. Biol.* 5, 465 (1966).

⁷ J. W. HARRIS, *Expl Cell Res.* 45, 487 (1967).

⁸ H. A. S. VAN DEN BREK and D. JAMIESON, *Int. J. Radiat. Biol.* 4, 379 (1962).

⁹ D. JAMIESON, *Nature* 209, 361 (1966).

¹⁰ R. GERSCHMAN, D. GILBERT, S. NYE, P. DWYER and W. FENN, *Science* 119, 623 (1954).

Free and total aryl sulfatase in rabbit polymorphonuclear leucocytes exposed to 5 ATA oxygen at 35 °C

Experiment	Exposure time (min)	Medium ^a	Aryl sulfatase			Free protein (% control)
			Free (% total)	Total (% control)	$\frac{\text{OHP free}}{\text{control free}} \times 100$	
1	0 ^b	C	2.0			
	50		1.8	116.4	90.0	92.2
2	0	B	2.1			
	30		1.8	98.5	85.7	103.7
3	0	A	—			
	30		—	91.0	—	100.0
4	0	A	6.3			
	30		10.0	101.0	158.7	119.4
5	0	A	25.8			
	30		19.7	98.0	76.4	113.7
6	0	A'	28.0			
	30		25.3	93.1	90.4	107.8
Means:				99.7	100.2	106.1

* Media: A, Hank's solution + 10 mM Tris, pH 7.4; A', same as A, pH 6.7; B, Hank's solution, pH 7.4; C, Tris buffered saline (Tris 0.005 M; Na₂ HPO₄, 0.005 M; NaCl 0.12 M; KCl 0.006 M; Mg SO₄ 0.002 M), pH 7.4. ^b Controls held in air at 35 °C for duration of exposure.

short exposures of either intact PMN cells or isolated PMN lysosomes.

While the response of lysosomes to specific stimuli may differ from one tissue to another, lysosomes isolated from rat liver and rat kidney release identical amounts of enzyme during incubation in oxygen as in nitrogen^{11,12}. In view of this fact and the results described in the present report, it is unlikely that direct release of lysosomal enzymes by oxygen is the primary lesion of oxygen poisoning, either in tissues of intact animals or in isolated cells. It is possible, of course, that lysosomal damage may occur as part of a complex reaction to the stress associated with exposure of animals to high pressure oxygen. However, the observation that such damage temporally precedes other biochemical lesions does not justify the conclusion that it causes them. The same comment applies for cells grown in oxygen; lysosomal damage in HeLa cells, for example, can hardly qualify as a primary injury when it is preceded (apparently by many hours) by impairment of DNA synthesis^{1,13,14}.

Zusammenfassung. Es wird nachgewiesen, dass hyperbare O₂-Behandlung die Freisetzung von Sulfatase aus lysosomen, beziehungsweise neutrophilen Leukozyten nicht beeinflusst.

J. W. HARRIS

Laboratory of Radiobiology, University of California Medical Center, San Francisco (California, USA), 19th June 1967.

¹¹ C. DE DUVE and H. BEAUFAY, *Biochem. J.* 73, 610 (1959).

¹² C. B. SLEDGE and J. T. DINGLE, *Nature* 205, 140 (1965).

¹³ R. M. DREW, R. B. PAINTER and L. E. FEINENDEGEN, *Expl Cell Res.* 36, 297 (1964).

¹⁴ This research was supported by a Postdoctoral Fellowship from the Australian Institute of Nuclear Science and Engineering. Sincere thanks are due to the Cancer Institute, Melbourne, Australia, for use of laboratory facilities and to Dr. H. A. S. VAN DEN BREK for helpful discussions during preparation of this manuscript.

PRO EXPERIMENTIS

Densitometrische Bestimmung von Proteinen in kleinen Volumen

Das Bindungsvermögen der Proteine für einige Farbstoffe wird in bedeutendem Masse zu deren quantitativer Detektion ausgenutzt, vor allem bei der Färbung verschiedener histologischer Präparate und bei der Sichtbarmachung von Elektrophoreogrammen. Bei der Anwendung von Amidoschwarz ist die Intensität der Färbung gegen die Menge der vorhandenen Eiweisskörper sehr empfindlich; es bietet sich dadurch eine Möglichkeit, die Proteinkonzentration in verhältnismässig sehr geringen Volumen der zu analysierenden Lösungen schnell zu bestimmen. Die Verfasser befassten sich eingehender mit diesem Problem und beschreiben in der vorliegenden Arbeit eine semiquantitative Methode zur Proteinbestimmung anhand der Färbungsintensität von Farbstesten in Agar.

Eine 1%ige Agarlösung in 0,1N NaOH wird heiss auf ein vollkommen entfettetes mikroskopisches Trägerglas aufgetragen. Nach Ablauf von 30 min werden auf die Oberfläche der ungefähr 2 mm dicken erstarrten Agarschicht die Proben durch Verdrängen eines bekannten Volumens der untersuchten Lösung aus einer kalibrierten Mikropipette aufgetragen. Das Auftragen der Proben kann mit Vorteil mittels einer Einrichtung ausgeführt werden, die in Figur 1 schematisch dargestellt ist. Die Mikropipette ist vertikal über dem Trägerglas angebracht und deren Bewegung in vertikaler und horizontaler Richtung wird von einer Mikroverschiebungs Vorrichtung beherrscht. Durch die Wahl eines genügend kleinen Durchmessers der Mikropipette können auf diese Weise Volumen bis zu einer Ordnung von 10⁻³ ml aufgetragen werden. Geringere Volumen bleiben unter der Einwirkung kapillarer Kräfte am äusseren Mantel der Pipette haften und dies kann auch durch weitere Veränderungen der geometrischen Dimensionen nicht verhindert werden. Die Kalibrierung kann durch radiometrische Bestimmung der Aktivität eines gegebenen Volumens der Lösung eines radioaktiv markierten Präparates, im gegebenen Falle

Na₃HP³²O₄, durch Verdrängung aus einer bis zum vorbestimmten Strich gefüllten Pipette ausgeführt werden.

Nach dem Auftragen der Proben wird das Trägerglas unter eine mit einem Chlorkalziumröhrchen versehene Glasglocke gelegt, die zugleich des Absetzen mechanischer Verunreinigungen aus der Atmosphäre verhindert, und die Agarschicht wird bei Raumtemperatur vollständig ausgetrocknet. Im Laufe des langsamen Trocknungsprozesses diffundiert das Protein in die Agarschicht ein, die im trockenen Zustand zu einem gegen mechanische Einflüsse verhältnismässig resistenten Film wird. Nach dem Austrocknen wird das Trägerglas in die Färbungslösung gelegt (1% Amidoschwarzlösung in einer 3%igen Essigsäurelösung), und nach dem Anfärben wird der

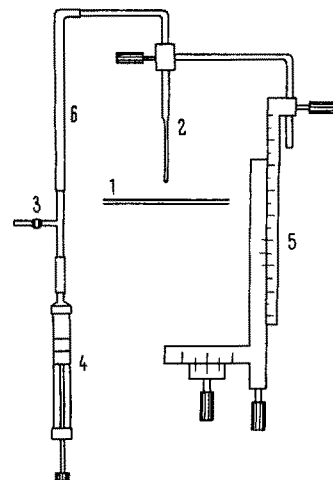


Fig. 1. Manipuliertorrichtung zur Auftragung von Proben. (1) Trägerglas mit Agargel, (2) kalibrierte Mikropipette, (3) Entlüftung, (4) Injektionsspritze, (5) Mikroverschiebvorrichtung, (6) Gumminverbindung.